



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
*Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap*  
*Institutionen Kliniska Vetenskaper*

# Artros - en sjukdom som drabbar både djur och människa, en komparativ studie med kaninen som modelldjur.

Maria Hägglund

*Uppsala*

*2010*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2010:74*



Artros - en sjukdom som drabbar  
både djur och människa, en  
komparativ studie med kaninen som  
modelldjur.

Maria Hägglund

*Handledare: Patricia Hedenqvist Institutionen för Kliniska vetenskaper  
Bitr. handledare: Marianne Jensen-Waern Institutionen för kliniska vetenskaper  
Examinator: Bernt Jones Institutionen för Kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska vetenskaper  
Kurskod: VM7199, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: Artros, osteoartrit, ledbrusk, leddskada, Bone morphogenic protein-2, BMP-2,  
hyaluronsyrahydrogel, kanin som modelldjur, bruskdefekt, djurmodell.*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN1652-8697*



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning .....	3
Bakgrund .....	4
Ledbrosk .....	4
Skador och reparation av ledbrosk .....	5
Osteoartrit .....	6
Osteoartrit hos människa .....	7
Osteoartrit hos hund .....	7
Osteoartrit på häst .....	8
Osteoartrit på gris .....	8
Djurmodeller för broskskador och osteoartrit .....	8
Djurslag .....	9
Ålder .....	9
Storlek och djup av defekten .....	10
Duration av försöket .....	10
BMP och behandling av skador i ledbrosk .....	10
Material och metoder .....	12
Djuren och studiens utformning .....	12
Premedicinering och anestesi .....	13
Operation .....	13
Postoperativ vård .....	14
Resultat .....	15
Vikter .....	15
Preoperativa blodvärden .....	15
Gradering av hälsa postoperativt .....	17

Postoperativ antibiotikabehandling.....	17
Diskussion.....	19
Vikter .....	19
Preoperativa blodvärden .....	19
Gradering av hälsa postoperativt.....	20
Postoperativ antibiotikabehandling.....	20
Slutsats .....	21
Litteraturförteckning.....	22

## **SAMMANFATTNING**

Artros och skador i ledbrosk är vanliga problem hos både människor och djur, som orsakar stora fysiska besvär i form av smärta och nedsatt rörelseförmåga. Idag finns ett flertal olika behandlingsmetoder mot artros, men ännu finns ingen bra behandlingsmetod för att åstadkomma läkning av ett skadat ledbrosk.

I den här studien användes kanin som modelldjur för att utvärdera en ny behandling mot artros på människa. Målet var att stimulera nybildning av ledbrosk via rekrytering av mesenkymala stamceller.

Studien utfördes på 20 kaniner av rasen New Zealand White, 6-7 månader gamla honor med en kroppsvikt på ca 4 kg. En ledskada skapades med borr på den mediala femurkondylen i kaninernas vänstra knäled under anestesi. Därefter injicerades en hyaluronsyragele enbart eller tillsammans med tillväxtfaktorn bone morphogenic protein-2 (BMP-2) i leden. En likadan skada skapades i den högra knäleden, men i denna injicerades istället koksaltlösning som kontrollbehandling. De två första veckorna postoperativt undersöktes kaninerna dagligen avseende allmäntillstånd och vikt. Knälederna undersöktes särskilt efter tecken på infektion och graden av hälta uppskattades på en 4-gradig skala. Efter tre månader (n=5) och sex månader (n=10) avlivades kaninerna och knälederna undersöktes histologiskt samt med magnetkamera (MRI) för att utvärdera nybildning av ledbrosk.

Studien utgör den kliniska delen av forskningsprojektet och i detta arbete presenteras resultaten från operationen och den postoperativa perioden.

## **SUMMARY**

Osteoarthritis and articular cartilage lesions are common problems affecting both people and animals, causing large amounts of pain and functional disability. Many different strategies have been used to treat osteoarthritis, but no good treatment to accomplish regeneration of damaged articular cartilage is available today.

In this study rabbits were used as a model for finding a new treatment against osteoarthritis in humans. The goal was to stimulate regeneration of damaged articular cartilage by recruitment of mesenchymal stem cells from subchondral bone.

The study was performed on 20 New Zealand White rabbits. A cartilage defect was induced on the medial femoral condyle in the left knee joint. The defects were treated with hyaluronan hydrogel containing the growth factor bone morphogenic protein-2 (BMP-2) or hyaluronan hydrogel itself. The same defect was induced in the rabbits' right knee joint which was injected with isotonic saline to serve as a control. The first weeks postoperatively the rabbits were examined every day. The knees were examined for signs of infection and the grade of lameness was estimated on a scale from 0 to 3. After surgery the animals were kept for three months (n=5) or six months (n=10) until they were euthanized. A pathological examination and a magnetic resonance imaging (MRI) of the knee joints were performed to evaluate the regeneration of articular cartilage.

The study is a part of a larger research project and in this assignment the results from the clinical part are presented.



## INLEDNING

Skador i ledbrosk är ett vanligt problem hos både människor och djur. Skador kan uppstå av trauma eller slitage och orsakar både stora fysiska lidanden och ekonomiska kostnader.

Ledbrosk (hyalint brosk) består av högspecialiserad vävnad som täcker skelettändarna i kroppens äkta leder. Ledbroskets funktion är att förbättra passformen mellan två skellettdelar samt att minska friktionen vid rörelse av leden. Brosket fungerar även stötdämpande och skyddar skelettet mot slitage. Det finns inga blodkärl i hyalint brosk utan näringstillförseln sker via diffusion från närliggande vävnad. Ledbrosk har en låg metabolism och dess förmåga till regeneration och reparation är därför begränsad. Eftersom brosk består av fullt differentierade chondrocyter krävs rekrytering av stamceller från det subchondrala benet för att nybildning ska kunna ske.

Idag används ett flertal olika metoder för att behandla skador i ledbrosk. Exempel på dessa är kirurgiska ingrepp, ledproteser, vävnadstransplantationer och regenerativa läkemedel (Temenoff & Mikos, 2000). Hittills har man inte med någon av dessa metoder lyckats regenerera ett skadat ledbrosk till fullo. Hyalint brosk med dess unika egenskaper behövs för att en led ska fungera optimalt. Den bästa lösningen vore därför att utveckla en regenerativ behandling som stimulerar nybildning av ledbrosk.

Kaninens benanatomi har betydligt större likheter med människans jämfört med t.ex. gnagare, vilka har en mer primitiv benstruktur (Rudert, 2002). Kaninen passar därför mycket bra som modelldjur för forskning om skelett och leder. Dess behändiga storlek gör även att den är mer lämpad att använda i en ortopedisk studie jämfört med många andra djurslag. Genom att använda kaninen som modell för broskskador kan nya behandlingsmetoder utvecklas som i framtiden kan komma att gynna både människor och djur.

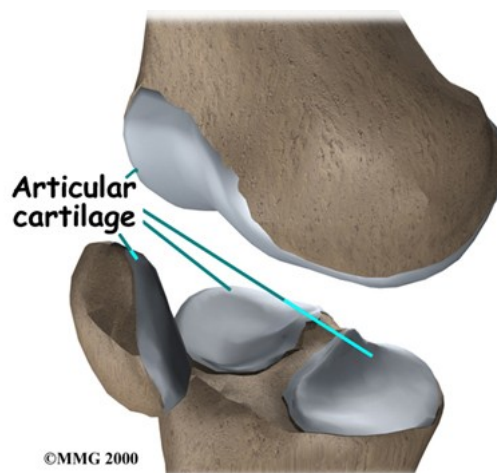
Syftet med den här studien var att genom att använda kaninen som modelldjur försöka hitta en ny typ av behandling för artros hos människor. Den nya behandlingen består av en hyaluronsyrahydrogel med en tillväxtfaktor, Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2). Genom injektion av hydrogelen tillsammans med BMP-2 i en led med en konstruerad lefskada är målet att stimulera nybildning av ledbrosk. Studien är en del av ett större forskningsprojekt och är ett samarbete mellan Sveriges Lantbruksuniversitet, Karolinska Institutet och Ångströmlaboratoriet. Medverkande i forskningsprojektet är Thomas Engstrand, specialist i plastikkirurgi, Karolinska universitetssjukhuset, Cecilia Aulin, forskare vid institutionen för materialkemi, Uppsala universitet samt professor, VMD Marianne Jensen-Waern och med.dr. Patricia Hedenqvist, Institutionen för Kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet. I detta arbete beskrivs den kliniska delen av försöket.

## BAKGRUND

### Ledbrosk

Brosk är uppbyggt av chondrocyter och ett extracellulärt matrix (Junqueira & Carneiro, 2005). Extracellulärt matrix består av proteoglykaner, glykosaminoglykaner, kollagen och elastiska fibrer. Beroende på dessa komponenters sammansättning kan tre olika brosktyper bildas; hyalint, elastiskt och fibröst brosk. Hyalint brosk är den vanligaste brosktypen och bekläder bl.a. ledytorna i kroppens synoviala leder (Bild 1).

Ledbrosk har till uppgift att minska friktionen i leden under rörelse (Temenoff & Mikos, 2000). Brosket utgör en slitstark yta som även ger ökad styrka mot komprimerande krafter. Hyalint brosk saknar både nerver, blod- och lymfkärl. Näringstillförsel till chondrocyterna sker därför via diffusion från närliggande vävnad. Detta medför att ledbrosk har en låg metabolism och dess förmåga att regenerera är därmed begränsad.



*Bild 1. Ledbrosk i en knäled från människa. Med tillstånd från Medical Multimedia Group, [www.eOrthopod.com](http://www.eOrthopod.com).*

Endast 1-5 % av volymen i ledbrosk utgörs av chondrocyter (Bhosale & Richardson, 2008). Chondrocyter är högspecialiserade celler som har till uppgift att syntetisera komponenterna som utgör extracellulärt matrix samt att bibehålla dess infrastruktur. Chondrocyter syntetiserar proteoglykaner, glykosaminoglykaner och kollagen.

Proteoglykaner är makromolekyler uppbyggda av en proteinkärna som ett stort antal kolhydrater kopplas till (Bhosale & Richardson, 2008). Dessa ger ledbrosket styrka att stå emot komprimerande krafter. Ca 10-20 % av ledbroskets vikt utgörs av proteoglykaner. Dessa makromolekyler bildar stora aggregat i matrix genom att kopplas till hyaluronsyra via kärnprotein, de kallas därför för aggreganter (Bild 2). Proteoglykanerna är uppbyggda av subenheter som kallas för glykosaminoglykaner (GAGs). Dessa består av repeterande disackarider med ett stort antal negativt laddade grupper (sulfat- och karboxylgrupper). Den negativa laddningen bidrar till att upprätthålla ett högt osmotiskt tryck i broskmatrix och drar därmed till sig stora mängder vatten. De negativa laddningarna ger även upphov till elasticitet i brosket genom att negativa laddningar repellerar varandra. Proteoglykaner upprätthåller därmed vätske- och elektrolytbalansen i brosket.

Studier har visat att vid osteoartrit minskar antalet aggregater i matrix vilket kan ha betydelse för broskets funktion.

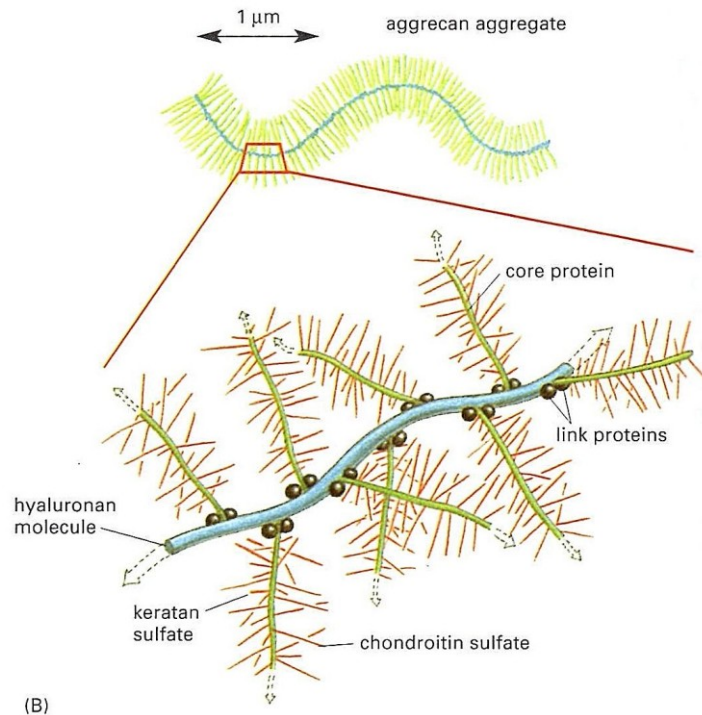


Bild 2. Stora aggregat av proteoglykaner bildar tillsammans aggregater i broskmatrix. Proteoglykaner är viktiga för att bibehålla vätske- och elektrolytbalansen i brosk. ©2004 Essential Cell Biology, second edition, Alberts et al. Med tillstånd från Garland Science/Taylor and Francis LLC.

Upp till 80 % av ledbroskets vikt består av vatten (Temenoff & Mikos, 2000; Bhosale & Richardson, 2008). Vattnet har en stötdämpande effekt då det tillåter en deformation av brosket vid belastning. Vid osteoartrit ökar vattenhalten i brosket till över 90 % på grund av förändringar i matrixstrukturen och ökad permeabilitet (Bhosale & Richardson, 2008). Detta försämrar ledbroskets elasticitet och stötdämpande förmåga.

Kollagen utgör ca 10-20 % av ledbroskets vikt (Bhosale & Richardson, 2008). Det finns olika typer av kollagen i olika brosktyper. Ledbrosk innehåller framför allt typ II kollagen som ger upphov till ett makrofibrillnätverk i matrix. Detta nätverk ger upphov till styrka mot töjbara krafter.

### Skador och reparation av ledbrosk

Skador i ledbrosk hos människa är vanligast i åldersgruppen 30-40 år (Bhosale & Richardson, 2008). Det är även relativt vanligt med skador hos unga vuxna i 20-30 års ålder, dessa uppstår framför allt som följd av akut traumatiska skador. Större allvarligare skador samt repetitiva mindre trauman kan senare leda till osteoartrit. Typiska symtom på skador i ledbrosket är exempelvis lokal smärta, svullnad, låsningar och hakningar i leden.

Kroppens svar på vävnadsskador är vanligen via en kaskad av inflammation, nekros, reparation och ärrbildning (Bhosale & Richardson, 2008). En förutsättning

för att denna kaskad och läkning ska kunna ske är att vävnaden är väl vaskulariserad. Då hyalint brosk saknar både blod och lymfkärl har det en nedsatt förmåga att läka och reparera skador. Storleken på skadan har dock betydelse, mindre skador kan läka helt vilket större skador aldrig gör.

Beroende på djupet av skadorna i ledbrasket kan de klassificeras som antingen chondrala eller osteochondrala (Bhosale & Richardson, 2008). De chondrala skadorna kan sedan delas upp i djupare lesioner, ner till det subchondrala benet, eller lindrigare lesioner. De osteochondrala skadorna är djupa chondrala skador som dessutom sträcker sig ner i det subchondrala benet. Hur djupa skadorna är påverkar reparationsprocessen av brosket. Skador som går ner i det subchondrala benet ger möjlighet till migration av mesenkymala stamceller från benmärgen ut i det defekta området. Detta resulterar i reparation via bildning av fibröst brosk. Fibröst brosk har dock en annan sammansättning än det hyalina brosket och är sämre lämpat att motstå komprimerande krafter, det har därmed en sämre stötdämpande funktion.

### **Osteoartrit**

Osteoartrit (även kallat osteoartros) är en degenerativ ledsjukdom som förekommer på alla djurslag som har ett benskett (Mc Gavin & Zachary, 2007). Osteoartrit kan drabba en eller flera synoviala leder. Sjukdomen kan vara symtomatisk eller asymtomatisk och den kan drabba både unga och äldre individer. Drabbade individer utvecklar olika grader av ledförstoring, smärta, deformation och malfunction av leden. Sjukdomens etiologi och patogenes är ännu inte helt utredd, men troligen är osteoartrit ett slutskede av diverse andra sjukdomar och skador som drabbar kroppens leder. Initiala skador kan uppstå av exempelvis traumatiska skador av ledbrasket, inflammation av synovialmembranet, förändringar i det subchondrala benet eller inkongruens mellan ledytorna.

I ett tidigt skede av osteoartrit sker en biokemisk förändring i ledbrasket (Mc Gavin & Zachary, 2007). Förändringar som ses är minskad mängd proteoglykanaggrekaner samt en ökad mängd vatten i broskmatrix. Detta resulterar i fokala förluster av det amorfa lager som täcker ledbrasket och ger upphov till slitskador på ytliga kollagenfibrer. Fortsatta förluster av proteoglykaner leder till försämrad glidförmåga i leden och destruktion av kollagenfibrer. Sekundära inflammatoriska ämnen utsöndras av skadade chondrocyter och synoviala makrofager som fagocyterat nedbrutna broskprodukter. Dessa ger upphov till synovit. Vid synovit ses villushypertrofi, hyperplasi av synoviocyter och infiltration av inflammatoriska celler. Synovialvätskan förändras och får minskad viskositet till följd av ökat plasmaläckage. De inflammatoriska produkterna kan tillsammans med inkongruens och instabilitet i leden senare ge upphov till förtjockning av ledkapseln och bildning av osteofyter.

Lesioner i ledbrasket kan ha fokal eller diffus utbredning (Mc Gavin & Zachary, 2007). Förlusten av proteoglykaner och ökningen av vattenhalten i matrix gör att brosket blir mjukt (chondromalaci). Det mjukare brosket har sämre hållbarhet mot slitage och erosioner och ulcerationer kan lättare uppstå. Fortsatt belastning på leden resulterar i att lesionen sprider sig till det subchondrala benet. Skleros,

subchondrala bencystor och ankylos är exempel på skador som kan uppstå som följd av osteoartrit.

### ***Osteoartrit hos människa***

Osteoartrit är den vanligaste ledsjukdomen på människa (Arden & Nevitt, 2006). Sjukdomen är den en av de vanligaste orsakerna till smärta och handikapp hos äldre. Kända riskfaktorerna för att utveckla osteoartrit är övervikt, genetiska faktorer, ledskador (såsom skador på ledband, mensisk och korsband) och anatomiska avvikelser (Anderson & Loeser, 2010). Andra faktorer som påverkar risken att drabbas av osteoartrit är kön och etnicitet (Moskowitz, 2009). De mest drabbade lederna är händer, knän, höfter och ryggrad.

Osteoartrit är starkt korrelerat till åldrande och risken att utveckla sjukdomen ökar markant efter 45 års ålder (Moskowitz, 2009). Förändringar som sker i ledbrösket som följd av åldrande skiljer sig dock från de patofysiologiska förändringarna som ses vid osteoartrit. Detta tyder på att åldersförändringar i ledbrösket inte alltid resulterar i osteoartrit, de är dock predisponerande och är troligen en viktig del i sjukdomens patogenes.

### ***Osteoartrit hos hund***

Osteoartrit (degenerativ joint disease, DJD) är den vanligaste diagnosticerade ledsjukdomen på hund (Nelson & Couto, 2003). Symtomen kommer ofta smygande och är begränsade till rörelseapparaten utan systemiska symtom. Initialt ses ofta hálta och stelhet efter överansträngning som kan förvärras vid kallt och fuktigt väder. Hundar som är lindrigt drabbade "värmer ofta ur" háltan då de motioneras. Då sjukdomen successivt förvärras resulterar den i fibros och smärta som ger konstant hálta, minskad träningstolerans och i allvarliga fall även muskelatrofi.

Osteoartrit kan drabba hundar i alla åldrar och raser (Fossum, 2007). Dysplastiska sjukdomar som leder till osteoartrit är dock ofta rasspecifika. Många hundar som visar symptom på osteoartrit är överviktiga. Övervikt tros vara en predisponerande faktor för att utveckla sjukdomen men skulle även kunna vara ett resultat av kronisk smärta och minskad motion.

Beroende på orsaken till sjukdomen kan osteoartrit klassificeras som primär eller sekundär (Fossum, 2007). Primär osteoartrit är en åldersrelaterad sjukdom som uppstår utan känd orsak. Sekundär osteoartrit uppstår till följd av en ledskada. Skadan kan exempelvis uppstå via trauma, onormal belastning (ex. utvecklings- och anatomiska defekter, som höftledsdysplasi), instabilitet i leden (ex. efter en korsbandsruptur) eller som följd av infektiösa eller immunmedierade ledsjukdomar. På hund är sekundär osteoartrit betydligt vanligare än primär osteoartrit. I hundens anamnes finns ofta problem som; ledfrakturer, osteochondros eller osteochondritis dissecans (OCD), kongenitala eller kroniska ledluxationer, inflammatorisk ledsjukdom, septisk artrit och/eller neurologiska lesioner. Osteoartrit på frambenens leder ses ofta i samband med fragmenterad processus coronoideus (FPC), ununited processus anconeus (UPA) eller vid prematur slutning av radius eller ulnas distala tillväxtzoner. Vanliga problem som orsakar osteoartrit på bakbenens leder är höftledsdysplasi, aseptisk nekros av femurhuvudet, patella luxation och korsbandsrupturer.

### **Osteoartrit på häst**

Osteoartrit är ett vanligt problem till hälta på häst (Robinson & Sprayberry, 2009). I allvarliga fall kan osteoartrit förstöra en elithästs karriär och resultera i permanent hälta. Ett flertal faktorer kan initiera osteoartrit och progressivt leda till ett slutstadium med degeneration och destruktions av en led. Exempel på orsaker till osteoartrit på häst är överbelastning eller träningsrelaterade skador, sepsis och andra traumatiska skador. Upprepade mikrotrauma som uppstår vid överträning och överbelastning är troligen den vanligaste orsaken till osteoartrit på häst (Ross, Dyson, 2003).

Tidiga tecken på osteoartrit hos häst är ackumulation av ledvätska ("galla") som kan palperas över leden (Robinson & Sprayberry, 2009). Leden kan även bli varm och öm. Graden av hälta kan variera kraftigt från fall till fall och kan ej korreleras till graden av broskförändringar som ses vid röntgen eller artroskopi (Ross & Dyson, 2003). Då ledbrosk saknar innervering uppstår smärtan från skador på intilliggande vävnad såsom subchondralt ben, ledkapsel och periartikulära mjukvävnader som ligament, senor och muskler.

### **Osteoartrit på gris**

Unga snabbt växande grisar drabbas ofta av icke-infektiösa ledproblem som involverar både osteochondros, epifyseolys och degenerativ osteoartrit (Radostits *et al.*, 2007). Sjukdomen drabbar grisar i fyra till åtta månaders ålder och karakteriseras av varierande grad av intermittent men progressiv hälta. Patologianatomiskt ses både osteochondros och osteoartrit. Exempel på problem som sjukdomen medför är; ökad spädgrisdödlighet till följd av att halta suggor lättare ligger ihjäl sina kultingar, nedsatt reproduktionsförmåga hos suggor, nedsatt betäckningsförmåga hos galtar, sämre tillväxt hos slaktgrisar på grund av minskad foderlust vid hälta och tidig utslagning. Detta ger upphov till merarbete för bonden i form av utgallring av sjuka grisar samt stora ekonomiska förluster inom grisproduktionen.

Orsaken till denna degenerativa sjukdom är ännu inte känd (Radostits *et al.*, 2007). Riskfaktorer som tros bidra till utveckling av sjukdomen är nutrition, tillväxttakt, raspre disposition, genetiska faktorer, kön och djurhållning (golvtyp, djurtäthet, möjlighet till motion och rörelse etc.). Dagens grisproduktion är väldigt intensiv och kräver grisar med snabb tillväxttakt och hög fodereffektivitet. Under dessa förhållanden utvecklar snabbväxande grisar ben- och ledproblem. Nästan alla grisar som närmar sig slaktvikt har varierande grad av osteochondros. Allvarligare former av osteochondros kan resultera i degenerativ leddsjukdom och hälta, detta är dock vanligare hos avelsdjur än hos slaktsvin. De lesioner som hittas på slaktsvin har oftast inte påverkat djurets tillväxttakt, men allvarligare lesioner förekommer även här.

### **Djurmodeller för broskskador och osteoartrit**

För att kunna studera patogenesen för skador i ledbrosk och potentiella terapeutiska metoder för leddskador på människa används djurmodeller (Bendele, 2001). Vid val av en djurmodell finns ett flertal viktiga faktorer att tänka på (Rudert, 2002). Några av de viktigaste faktorerna involverar djurslag, ålder på djuren, storlek och djup på defekten samt duration av försöket.

## **Djurslag**

Anatomin hos det utvalda djurslaget bör vara relativt lik målartens anatomi (Rudert, 2002). Detta är viktigt för att informationen och resultatet från studien ska vara relevant vid utveckling av behandlingsmetoder för människa. De flesta däggdjur uppfyller dessa krav. En viktig nackdel som man måste ta hänsyn till är dock att de flesta djur går på fyra ben istället för två, detta innebär att lederna belastas annorlunda än hos människor. Potentiella modelldjur är råttor, kanin, hund, gris, får, get och häst.

Kaninens knä visar stora likheter med det mänskliga knäet avseende bengeometri och brosk (Rudert, 2002). Några skillnader finns dock. Kaniner har en artspecifik sena från *musculus extensor digitorum communis* som utgår från distala femur och passerar över den laterala femurkondylen. En annan skillnad är att patellarfåran på femur är längre på kaniner än hos människa. Detta beror troligen på kaninens huksittande kroppshållning. Kaninens kraftiga flexion i knäleden i kombination med dess låga kroppsvikt ger även en annorlunda belastning på knäleden i jämförelse med människor och större djurslag (Chu *et al.*, 2010).

Vid val av modelldjur är det viktigt att tänka på djurets egen förmåga att läka en ledbrosskada (Rudert, 2002). Detta är viktigt eftersom en broskdefekt kan läka spontant (dvs. utan tillförsel av läkemedel) och därmed försvåra tolkningen av försökets resultat. Enligt studier förekommer inte ärrlös regeneration av osteochondrala defekter på kaniner. Detta innebär att äret från en broskdefekt som läkt kan ses vid en patologianatomisk undersökning. Däremot förekommer fullständig läkning av benvävnad, menisk och korsband.

Dimensionsskillnaderna i anatomin mellan små laboratoriedjur och människa är mycket stora (Rudert, 2002). För att kunna få jämförelsebar storlek, djup och dimension på brosskadorna skulle större djur behöva användas, exempelvis hästar. I de flesta fall är det dock omöjligt att använda hästar på grund av att kostnaderna skulle bli alldeles för höga. Som alternativ till hästar används ofta hundar eller får istället. Enligt litteraturen är kaninen det bäst lämpade modelldjuret för broskstudier med avseende på anatomi, inhysning, självläkande förmåga och ekonomi. Dessutom ger en kaninmodell upphov till goda möjligheter att jämföra resultatet av en studie med tidigare forskningsresultat. Andra djurslag som mindre frekvent används som broskmodell för människa är får, gris och hund.

## **Ålder**

Åldern på djuren i ett försök har stor betydelse (Rudert, 2002). Unga djur har bättre läkningsförmåga än äldre djur. Den bättre läkningskapaciteten gäller dock framför allt defekter i det subchondrala benet. Defekter i ledbrosk läker inte tillfredställande hos unga eller äldre kaniner. Kaniner är könsmogna vid sex månaders ålder. En sex månaders kanin har dock inte vuxit klart ännu och vissa författare menar därför att äldre kaniner bör användas. Vid preliminära studier spelar det dock ingen större roll om yngre djur används eftersom den självläkande förmågan i ledbrosk inte är optimal hos vare sig yngre eller äldre kaniner.

### **Storlek och djup av defekten**

Defekten bör vara tillräckligt stor så att den utsätts för avseendevärd belastning utan att det riskerar att uppstå en fraktur i knäets femurkondyler (Rudert, 2002). Det är även viktigt att defekten går att upprepa, så att den blir lika hos alla djur som ingår i försöket. Tidigare studier har visat att en defekt på 3 mm i diameter fungerar bra att göra i både knäets patellarfåra och på femurkondylerna. För att orsaka en osteochondral defekt måste det subchondrala benet penetreras och benmärgen blottas. Detta kan göras med hjälp av en borr. Rätt djup på defekten har nåtts då en mindre blödning kan observeras på benets yta.

### **Duration av försöket**

Hur länge bör man avvakta efter ett ingrepp för att utvärdera resultatet? På kanin har positiva resultat har setts av tidig läkning 12 v efter en 3 mm osteochondral defekt (Rudert, 2002). Denna vävnad skiljer sig dock biokemiskt och strukturellt från normalt hyalint brosk och degenererar med tiden (Sellers *et al.*, 2000). Därför rekommenderas minst sex månaders läkningstid innan slutlig utvärdering sker (Rudert, 2002).

### **BMP och behandling av skador i ledbrosk**

Idag används ett flertal olika metoder för att behandla skador i ledbrosk ex. kirurgiska ingrepp, ledproteser, vävnadstransplantationer och regenerativa läkemedel (Temenoff & Mikos, 2000). Användning av ledproteser innebär ett stort invasivt ingrepp som i sig inte kan garantera en långsiktig funktion i leden för yngre människor då proteserna har begränsad livslängd (15-20 år) (Dubey & Adebajo, 2008). Med hjälp av alternativa metoder som vävnadstransplantation och regenerativa läkemedel är målet att hitta en långsiktig lösning med funktionell, levande vävnad (Temenoff & Mikos, 2000). Genom att tillföra tillväxtfaktorer och morfogener (ämnen som styr embryonal differentiering av celler och vävnader) till leden kan regeneration och reparation av den skadade vävnaden stimuleras genom att utnyttja kroppens egen läkande förmåga. Denna metod kräver dock att stamceller finns närvarande från det subchondrala benet.

Benmorfogena proteiner (BMP) identifierades först som en grupp proteiner som kan inducera brosk- och benbildning genom att påverka stamceller i chondrocyt- och osteoblastlinjen (Miyazono, 2002). BMP har senare visat sig vara multifunktionella cytokiner som kan påverka en mängd olika biologiska processer i ett flertal olika celltyper bl.a. epitelceller, mesenkymala celler, nervceller och monocyter. Mer än 12 olika proteiner har identifierats i BMP-familjen och de kan delas upp efter struktur och funktion. BMP tillhör en större grupp proteiner som kallas för Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\beta$ ).

Benmorfogent protein-2 (BMP-2) är involverat i tillväxt och differentiering av mesenkymala stamceller till chondrocyter och osteoblaster under embryoutvecklingen (Rountree *et al.*, 2004). Proteinet spelar även en viktig roll för bibehållandet av ledbrosk hos vuxna individer. En tidigare studie av broskskador med kanin som modelldjur har visat att en bättre läkning av ledbrosk kan uppnås genom att injicera BMP-2 tillsammans med kollagen i leden (Sellers *et al.*, 2000). Denna studie visade på förbättrad bildning av hyalint brosk men ingen fullständig läkning av ledbrosket.



Materialet som används för att föra in BMP-2 i en led har visat sig kunna påverka läkningsprocessen vid broskskador. I en studie 2010 använde sig Aulin *et al*, av ett hyaluron hydrogel-system som transportmedium till BMP-2. Hyaluronsyra och polysackarider utgör en naturlig miljö för broskcellerna, de har även en viktig roll vid celldifferentiering och bibehållandet av ledbrosket. Hyaluron hydrogel-systemet är ett tvåkomponentsystem bestående av aldehydmodifierad hyaluronsyra som är kopplad till en hydrazid-modifierad polyvinylalkohol (Aulin *et al*, 2010). I studien visades *in vitro* att BMP-2 inducerar differentiering av chondrocyter och mesenkymala celler odlade i hyaluronsyre-hydrogel. En pilotstudie för regeneration av skador i ledbrosk *in vivo* med kanin som modelldjur har nyligen publicerats (Aulin *et al*, 2010). Resultaten visade att behandling med BMP-2 och hyaluronsyre-hydrogel ledde till regeneration av brosk med bättre kvalitet och högre frekvens av kollagen typ II fibrer än obehandlade kontroller. Studien indikerade även att hyaluronsyra-hydrogelen i sig själv gagnar regeneration av ledbrosk.

## MATERIAL OCH METODER

### Djuren och studiens utformning

Tjugo kaniner av rasen New Zealand White köptes in från en uppfödning som är fri från kända kaninpatogener (Lidköpings kaninfarm, Sverige). Alla kaniner var honor och 6-7 månader gamla vid ankomst. Kaninerna förvarades i lösdrift på golv i 1,4-2,0 m<sup>2</sup> stora boxar, med 2-3 kaniner i varje box (Bild 3). De hade fri tillgång till vatten och utfodrades med kaninfoder i pelletsform (Lactamin K3, Lantmännen, Sverige) samt hö. Innan försökets början fick kaninerna acklimatisera sig till den nya miljön i tre veckor. Kaninerna vandes vid hantering och vägdes dagligen i fem dagar före operationen, vid två tillfällen tränades de även vid stödutfodring med spruta (Critical care, Oxbow Animal Health Murdock, NE, USA). Dagen före operation gjordes en klinisk undersökning av kaninerna för att säkerställa att de var vid god hälsa. Ett blodprov togs preoperativt för analys av hematologiska parametrar inklusive totalantal vita blodkroppar med differentialräkning (Advia 2120, Siemens Healthcare System, Irland), samt akutfasproteinet serumamyloid A (SAA) (ELISA, Tridelata Development Ltd, Irland). Blodprov togs även för analys av SAA tre dagar samt en månad postoperativt.



*Bild 3. Kaninerna förvarades i lösdrift med 2-3 kaniner i varje box. Boxarna var 1,4-2,0 m<sup>2</sup> stora.*

Innan kirurgi togs ett synoviaprov (ca 0,2 ml) från kaninens knäleder, dessa sparades i frys (-80 °C) för senare analys av inflammatoriska markörer. Efter operationen planeras djuren hållas i tre (n=5) resp. sex månader (n=10), för att sedan avlivas med en överdos av apotekets Avlivningsvätska. Efter avlivning planeras en patalog-anatomisk och histologisk undersökning av kaninernas knän, liksom en högupplöst tredimensionell magnetresonans-undersökning (MRI) (9,4 T, Varian). Resultaten från dessa undersökningar förelåg inte vid skrivandet av examensarbetet.

Studien godkändes av försöksdjursetiska nämnden i Uppsala (Dnr C158/10).

### **Premedicinering och anestesi**

Kaninerna sederades med 0,1 mg/kg medetomidin (Domitor vet, 1 mg/ml, Orion Pharma AB, Animal Health, Sverige) subkutan. För att minimera risken för infektion administrerades 10 mg/kg ceftiofur (Excenel vet, 50 mg/ml, Orion Pharma AB, Animal Health, Sverige) intramuskulärt ca 60 minuter före operation. Kaninernas öron smörjdes med EMLA-kräm (Astra Zeneca, Sverige) för att möjliggöra smärtfri införsel av ven- (Neoflon 24G, BD AB, Sverige) och artärkateter (Insyte-W, 22G, BD AB, Sverige).

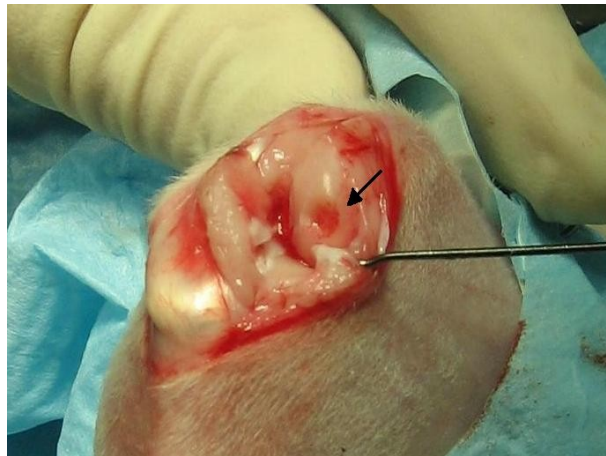
Allmän anestesi inducerades genom tillförsel av en blandning av sufentanil 2,3 µg/ml (50 µg/ml, Jansen-Cilag, Sverige) och midazolam 0,45 mg/ml (5 mg/ml, Actavis AB, Sverige) intravenöst via venkatetern. Kaninens svalg sprejades med 0,5 ml lidocain (Xylocain, 10 mg/ml, Astra Zeneca, Sverige) 1 min före intubering. Kaninen intuberades med hjälp av ett laryngoskop som är speciellt framtaget för kanin (Flecknell™, Alstoe Ltd. Animal Health, Storbritannien). Anestesi upprätthölls genom tillförsel av 1,5-3 % isofluran (Isoba vet, Intervet, Sverige) i en blandning av 40 % luft och 60 % syre i ett flöde av 1,5 l/min (n=10), eller via intravenös infusion av sufentanil och midazolam (n=9). Effekten av de olika anestesimetoderna på kardiovaskulär stabilitet redovisas i en separat studie (Hedenqvist *et al.*, in manuscript). Kaninerna lottades till anestesisgrupper och därefter lottades olika behandling inom varje anestesisgrupp.

Under operationen administrerades 10 ml/kg/h Ringer-Acetat intravenöst (Fresenius Kabi, Sverige). Blodtryck, hjärtfrekvens, andningsfrekvens, rektaltemperatur, end-tidal O<sub>2</sub> och CO<sub>2</sub> samt syremättnad övervakades (CS/3, Datex-Engstrom, Finland) kontinuerligt och registrerades var 10e min under anestesi. Kaninen låg på en värmedyna under operationen. Kaniner som inte andades spontant eller uppvisade end-tidalt CO<sub>2</sub> >8 kPa kopplades till en ventilator (JB1, Anmedic AB, Sverige). Blodgaser mättes under anestesi för övervakning av respiration och cirkulation.

### **Operation**

Operationsområdet klipptes, tvättades med klorhexidintvål och sprittvättades. Innan operationen påbörjades togs ett synoviaprov (ca 0,2 ml) från knäleden med en spruta och injektionskanyl (0,6 mm diameter). Artrotomi av kaninens vänstra tibiofemoral-led (knäled) genomfördes genom ett medialt longitudinellt parapatellärt snitt. Patellan dislokerades lateralt och knäleden böjdes maximalt för att exponera femurkondylernas ledyta. En 4 mm stor och 2 mm djup defekt skapades i den mediala kondylen genom att borra ner till det subchondrala benet med en Midas Rex borr (Medtronic, Sverige). Tillgång till stamceller försäkrades genom en synlig blödning från det subchondrala benet (Bild 4). Därefter reponerades patellan till ursprunglig position. En injektionskanyl (0,6 mm diameter) placerades genom huden in i tibiofemoral-leden och därefter suturerades ledkapseln tätt med resorberbar 4-0 vicryl (Ethicon, Sverige). En volym av 0,4 ml hyaluronsyra-hydrogel (grupp Gel, n=10) eller hyaluronsyra-hydrogel innehållande 150 µg/ml BMP-2 (grupp BMP-2, n=9) injicerades i knäleden. Huden suturerades intrakutan med resorberbar 4-0 monocryl (Ethicon, Sverige).

Samma ingrepp upprepades på kaninens högra knäled. Denna led utgjorde kontrollknä och 0,4 ml isoton natriumkloridlösning injicerades istället för hydrogel/hydrogel BMP-blandning i leden.



*Bild 4. Operation av höger knäled. Pilen visar den borrade defekten på 4 mm i diameter på mediala kondylen. Tillgång till stamceller försäkrades genom en synlig blödning från det subchondrala benet.*

### **Postoperativ vård**

Direkt efter avslutad operation fick kaninerna smärtlindring i form av 0,03 mg/kg buprenorfin (Temgesic, 0,3 mg/ml, Schering-Plough AB, Sverige) intravenöst och 0,02 mg/kg subkutant. När kaninen var fullt vaken och alert fick den återvända till sin hembox. De första tre dagarna efter ingreppet behandlades kaninerna för postoperativ smärta med 0,03-0,05 mg/kg buprenorfin subkutant två ggr/dag. Om kaninerna fortfarande visade tydlig hälta efter tre dagar, förlängdes behandlingen i upp till fem dagar.

Kaninerna vägdes och undersöktes kliniskt dagligen i 3 veckor efter operationen. Knälederna undersöktes och graden av hälta uppskattades på en skala från 0-3. Särskild vikt fästes vid tecken på inflammation. Grad 0 innebar ingen synlig hälta, grad 1 lindrig hälta, grad 2 kraftig hälta och grad 3 blockhälta, dvs. belastar ej benet i rörelse. Kaniner som uppvisade tecken på infektion behandlades med 5 mg/kg enrofloxacin (Baytril vet, 25 mg/ml, Bayer Animal Health, Danmark) subkutant två gånger per dag i ca 3 veckor. När kroppsvikten hade stabiliserats och kaninerna var fria från hälta, undersöktes och vägdes de en gång i veckan. Kaniner som minskade mer än 10 % av sin preoperativa kroppsvikt stödmatades med 15 ml Critical care (Oxbow) en gång dagligen tills kroppsvikten stabiliserats.

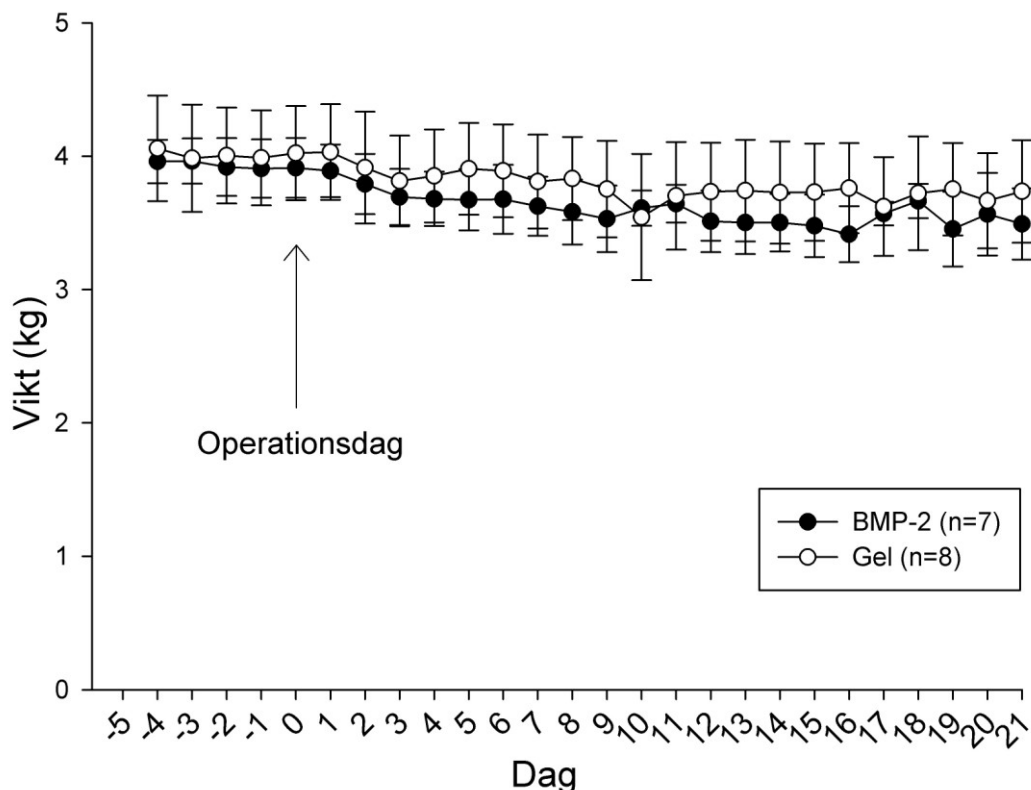
## RESULTAT

En kanin uteslöts ur studien till följd av en subklinisk infektion som upptäcktes vid blodanalys inför operation. Dessutom dog en kanin efter operationen, två avlivades på grund av infektion i knäleden och en pga. av patellaluxation. Obduktion av kaninen som dog efter operationen visade akut hjärnblödning och cirkulatorisk svikt. Det slutliga antal kaniner som ingick i studien blev därför 15st (BMP-2 n=7, Gel n=8).

### Vikter

Kaninernas kroppsvikt sjönk de första två veckorna efter operationen med i medel ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )  $0,40 \pm 0,15$  kg därefter stabiliserades eller steg vikten igen (Figur 1). Den högsta vikten före operation jämfördes med den lägsta vikten efter operation inom varje behandlingsgrupp i en parat t-test. Skillnaden var signifikant i båda grupperna ( $p < 0,001$  (BMP-2) resp.  $p = 0,001$  (Gel)). En kanin drabbades av patellaluxation tre veckor efter operationen, den minskade därefter snabbt i vikt och fick avlivas.

### Kroppsvikt före och efter kirurgi (medel $\pm$ SD)



Figur 1. Medelvärde av kaninernas kroppsvikt före och efter kirurgi.

### Preoperativa blodvärden

Vid analys av hematologiska parametrar låg värdena för alla kaniner utom en inom referenserna (Bolliger *et al.*, 2010). Blodvärdena visas i tabell 1. Den kanin som utmärkte sig (nr 3), hade förhöjt Hb (hemoglobin), EPK (erythrocyt-partikelkoncentration) och EVF (hematokrit) samt något lågt MCHC (medel-

cellhemoglobin-koncentration). Eftersom kanin nr 3 uteslöts ur studien, ingår inte dess värden i tabell 1. Samtliga kaniners värden redovisas i bilaga 1.

Tabell 1. Preoperativ analys av röd blodbild ( $n=19$ )

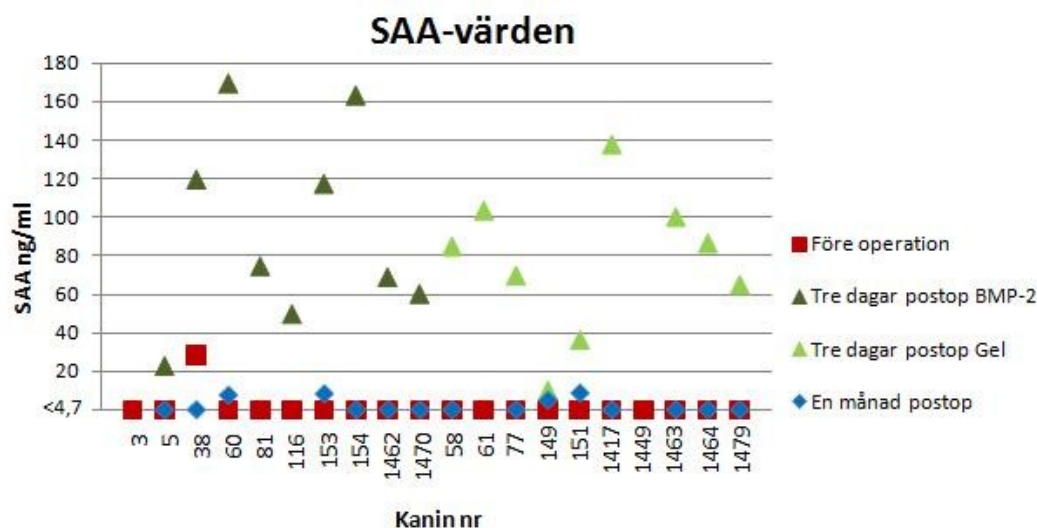
Röd blodbild	B-EPK $10^{12}/L$	B-Hb g/L	B-EVF	B-MCV fL	B-MCHC g/L	Ery-Reticulocuter %
Medel $\pm$ SD	$5,4 \pm 0,5$	$118 \pm 10$	$0,34 \pm 0,03$	$63 \pm 2$	$343 \pm 7$	$2 \pm 1$
Range	4,6 - 6,2	101 - 136	0,31 - 0,39	59 - 67	330 - 353	1 - 4

Vid analys av totalantalet vita blodkroppar med differentialräkning låg de flesta kaninernas värden inom referenserna (Bolliger *et al.*, 2010). Värdena redovisas i tabell 2. Några kaniner hade dock avvikande värden. Kanin nummer 3 hade ett kraftigt ökat antal neutrofiler. Den hade även förhöjt LPK (leukocyt-partikkelkoncentration) i förhållande till de andra kaninerna i vår studie, men vid jämförelse med andra studier låg LPK inom normalvariationen. Tre kaniner (nr 1470, 149 och 151) hade lågt LPK och kanin nummer 1464 hade lågt antal neutrofiler. Kanin nummer 116 hade ett lågt antal neutrofiler och ett förhöjt antal lymfocyter. Eftersom kanin nr 3 uteslöts ur studien, ingår inte dess värden i tabell 2. Samtliga kaniners värden återfinns i bilaga 2.

Tabell 2. Preoperativ analys av totalantal vita blodkroppar med differentialräkning ( $n=19$ )

Vit blodbild	B-LPK $10^9/L$	B-Neutrofiler $10^9/L$	B-Eosinofiler $10^9/L$	B-Basofiler $10^9/L$	B-Lymf $10^9/L$	B-Monocyter $10^9/L$
Medel $\pm$ SD	$5,2 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,6$	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	$3,2 \pm 1,4$	$0,2 \pm 0,1$
Range	3,1 - 7,3	0,2 - 2,5	<0,1 - 0,2	0,0 - 0,8	1,0 - 5,9	0,0 - 0,4

SAA-värden mättes preoperativt samt tre dagar och en månad postoperativt. SAA-värdena redovisas i Figur 2. De preoperativa SAA-värdena låg under mätbara nivåer (<4,7 ng/ml) hos alla kaniner utom en. Kaninen som utmärkte sig från de övriga hade redan innan operation lätt förhöjt SAA-värde. Tre dagar efter operation steg SAA-nivåerna markant hos alla kaniner för att sedan minska kraftigt igen vid provtagningen en månad postoperativt.



Figur 2. SAA-värden i ng/ml före operation samt tre dagar och en månad postoperativt. Värdena tre dagar postoperativt är uppdelade efter behandling (BMP-2 eller Gel).

### Gradering av hälta postoperativt

Under den postoperativa tiden var 7 kaniner helt fria från hälta medan 11 kaniner uppvisade tecken på hälta vid ett eller flera tillfällen. Hältan varierade från grad 1 till grad 3, men de flesta kaninerna hade ingen eller låggradig hälta (Tabell 3). Sju kaniner uppvisade kraftigare hälta (grad 2-3), och behandlades med 0,03 mg/kg buprenorfin subkutan två gånger per dag i upp till 5 dagar. Ingen signifikant skillnad kunde ses i graden av hälta vid en jämförelse (Mann-Whitney test) mellan behandlat och obehandlat ben i vare sig BMP-2 ( $p=0,57$ ) eller Gel-gruppen ( $p=0,80$ ).

Tabell 3. Antal kaniner med respektive grad av hälta

Ben	Grupp BMP-2		Grupp Gel	
	Ingen eller låggradig hälta (Grad 0-1)	Höggradig hälta (Grad 2-3)	Ingen eller låggradig hälta (Grad 0-1)	Höggradig hälta (Grad 2-3)
Behandlat ben	7/9	2/9	8/9	1/9
Kontrollben	5/9	4/9	8/9	1/9

Diagnosen patellaluxation ställdes på sammanlagt tre kaniner. En av dessa avlivades till följd plötsligt insatt hälta (grad 3) samt kraftig viktminskning trots analgetisk behandling. De övriga två kaninerna med patellaluxation var fria från hälta (grad 0) men hade en förändrad benställning i form av en utåtvridning av tassens.

### Postoperativ antibiotikabehandling

Under den postoperativa tiden behandlades ett flertal kaniner med antibiotika på grund av misstanke om infektion i knäleden eller avsevärd minskning av kroppsvikten. Sammanlagt behandlades 11 kaniner med 5 mg/kg enrofloxacin

(Baytril vet, 25 mg/ml, Bayer Animal Health, Danmark) subkutan två gånger per dag i 2-3 veckor.



## DISKUSSION

### Vikter

Att kaninernas vikter sjönk den första tiden efter operationen var väntat. Orsaken till viktminskningen är mest troligt obehag och smärta från det kirurgiska ingreppet som resulterat i minskad foderlust. Proinflammatoriska cytokiner (t ex. IL-1) som bildas vid vävnadsskada minskar vatten- och foderintag och ger upphov till en allmän sjukdomskänsla (Shevit *et al.*, 2005). Att kroppsvikterna sedan stabiliserades och hos flertalet kaniner även steg några veckor efter ingreppet visar att obehaget från knälederna successivt minskat eller försvunnit helt. Nivåerna av akutfasproteinet SAA (induceras av IL-1), som var kraftigt förhöjda tre dagar postoperativt, hade också minskat till normala nivåer en månad efter operationen. Kirurgi leder ofrånkomligt till en stressinducerad ökning av metabolismen och en negativ kvävebalans, som delvis kan reduceras med analgetisk behandling (Karas *et al.*, 2008). Kaninerna behandlades med en opioid (buprenorfin) mot smärta under och efter kirurgi, som i flera studier visats begränsa viktminskning efter kirurgi hos råttor (Flecknell, 2009). Optimalt hade varit att även ge ett antiinflammatoriskt medel (NSAID, t ex karprofen), vilket inte var möjligt i denna studie eftersom det skulle ha påverkat utvärderingen.

### Preoperativa blodvärden

Merparten av kaninerna hade preoperativa blodvärden som låg inom referenserna (Bolliger *et al.*, 2010), vilket tolkas som att de var friska och fria från infektioner. En kanin hade avvikande värden både i röd- och vit blodbild. Det förhöjda antalet vita blodkroppar och neutrofiler tyder på en bakteriell infektion. De förhöjda Hb-, EPK- och EVF-värdena orsakades mest troligt av en dehydrering i samband med infektionen. Mindre troliga orsaker skulle kunna vara tömning av mjältreserven (ses framför allt på hästar och katter som har stor reservkapacitet av röda blodkroppar i mjälten) och polycytemi (sjuklig ökning av antal röda blodkroppar). Lågt MCHC ses när erytrocyterna har minskad hemoglobinkoncentration, detta uppstår vid olika former av anemier (Hillström *et al.*, 2008). Falskt lågt MCHC kan dock ses vid lång förvaring av blodprov i EDTA, vilket troligen är förklaringen i det här fallet. Kaninen med dessa avvikande blodvärden uteslöts ur studien och behandling med antibiotikum påbörjades. Några dagar senare hittades kaninen död. Obduktionsresultaten visade på kraftig leverförfettnings, lös avföring i tarmen och en tom magsäck. Kaninen uppvisade även tecken på att den varit i slagsmål och hade sår i huden på kroppen. Innan kaninen dog hade den minskat kraftigt i kroppsvikt, trots detta bedömdes hullet till över medelgott vid obduktionen. Leverförfettningsen kan ha uppkommit till följd av otillräckligt födointag i kombination med övervikt. Kaninen isolerades när antibiotikabehandlingen inleddes, men dessförinnan gick den tillammans med en annan kanin som kan ha hindrat kaninen från att äta och dricka tillräckligt. Detta visar riskerna med att hålla kaniner i par eller grupp. Övriga kaniner har inte visat tecken på slagsmål och har alla gått upp i vikt efter operationen, vilket visar att par- resp. grupphållningen övervägande fungerat bra. Fördelarna med grupphållning är att kaninerna får sina sociala behov tillfredsställda och att tristessen minskar.

Tre kaniner hade lågt totalantal vita blodkroppar och en kanin hade lågt antal neutrofiler. Leukopeni kan ses vid benmärgspåverkan som leder till nedsatt

blodcellsproduktion eller vid infektion med kraftigt ökad förbrukning av vita blodkroppar, framför allt neutrofiler, ute i vävnaderna (Hillström *et al.*, 2008). Virala infektioner och sepsis kan också ge upphov till leukopeni, vilket förefaller osannolikt för dessa kaniner. Andra faktorer som bör vägas in vid tolkning av antalet vita blodkroppar är dygnsvariation, stress och individuella variationer. Då blodbilden hos kanin ej är lika utredd som på andra djurslag bör tolkningar av prover göras med försiktighet. Dagens referensvärden för kanin är framtagna från ett begränsat antal studier, detta innebär att även värden utanför referensområdet kan tillhöra normalvariationen om man ser till en större population.

En kanin hade förhöjt antal lymfocyter och lågt antal neutrofiler. Förhöjt antal lymfocyter kan exempelvis ses i återhämtningsfasen från en infektion eller vid lymfocytär leukemi (Hillström *et al.*, 2008). Vid lymfocytär leukemi ses en mycket kraftig ökning av lymfocyter, vilket inte sågs i vårt fall. En tidigare infektion skulle däremot kunna ha orsakat det förhöjda lymfocytvärdet.

Kaninernas SAA-värden låg lågt innan operationen, därefter steg de tre dagar efter operationen för att sedan sjunka igen en månad postoperativt. Att värdena låg lågt före ingreppet tyder på att kaninerna var friska och inte hade någon akut inflammation. Att värdena sedan steg efter operationen var väntat eftersom ett operativt ingrepp alltid leder till en viss inflammation. SAA-värdena en månad postoperativt visar att den akuta inflammationen efter ingreppet lagt sig och tyder på att kaninerna återhämtat sig bra.

### **Postoperativ gradering av hälta**

De flesta kaninerna var fria från hälta efter operationen. Vissa kaniner var dock halta i flera dagar postoperativt. Genom att minska defekten i kondylen från 4 mm i diameter till 3 mm skulle eventuellt smärtan och hältan kunna reduceras postoperativt. En 3 mm defekt har beskrivits vara tillräcklig för studier av broskdefekter i knän hos kanin (Rudert, 2002). Genom att minska injektionsvolymen av hyaluronsyrahydrogelen från 0,4 ml till 0,3 ml skulle även trycket i leden kunna minskas och på så vis skulle obehag och smärta reduceras.

Resultatet från graderingen av hälta visade ingen signifikant skillnad mellan behandlat och obehandlat ben i BMP-2 och Gel-gruppen. Detta indikerar att varken hyaluronsyrahydrogelen eller BMP-2 har en smärtlindrande effekt.

### **Postoperativ antibiotikabehandling**

Flertalet kaniner behandlades med antibiotika postoperativt till följd av misstanke om infektion i knäleden och avsevärd viktninskning (10-15 %). Två kaniner fick dessutom avlivas p.g.a. infektion. Bakterieodling visade på växt av *Staphylococcus aureus*. Detta tyder på att operationsförhållandena inte var helt aseptiska. En orsak kan vara att operationssalen ej var optimal då den saknar övertrycksventilation samt tättslutande dörrar och golv. För att förhindra infektion kunde den förebyggande antibiotikabehandlingen följts upp några dagar postoperativt.

Vid total knäplastik (TKR) på människa byts hela knäleden ut mot en konstgjord led genom öppen kirurgi. Frekvensen av septiska artriter efter ett sådant ingrepp är 1,6 % (Wilson *et al.*, 1990). I jämförelse med dessa siffror har kaninerna i vår

studie blivit behandlade mot misstänkt infektion i betydligt högre frekvens. Det bör dock betänkas septisk artrit inte diagnostiserats hos fler än tre kaniner. Antibiotikabehandlingen sattes även in på kaniner som minskat närmare 15 % i kroppsvikt samt på kaniner med yttlig sårinfektion.

### **Slutsats**

Den kliniska delen av det här försöket har visat att kaninmodellen tycks fungera tillfredsställande. Operation och narkos fortlöpte relativt komplikationsfritt och den kliniska uppföljningen med blodprovsanalyser har fungerat bra. Huruvida hydrogelen och BMP-2 kan påverka läkningen av skador i ledbrosk kommer att undersökas via histopatologi och MRI.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Anderson A.S, Loeser F.R. 2010. Review: Why is osteoarthritis an age-related disease? Best Practice & Research Clinical Rheumatology 24. Sid 15-26
- Arden N, Nevitt M.C. 2006. Osteoarthritis: Epidemiology. Best Practice & research. Clinical Rheumatology. Vol 20. Sid 3-25
- Aulin C, Bergman K, Jensen-Waern M, Hedenqvist P, Hilborn J, Engstrand T. In situ cross-linkable hyaluronan hydrogel enhances chondrogenesis. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Under tryckning 2010.
- Bhosale A.M, Richardson J.B. 2008. Review: Articular cartilage: structure, injuries and review of management. British Medical Bulletin. Vol 87. Sid 77-95
- Bolliger A.P, Everds N.E, Zimmerman K.L, Moore D.M, Smith S.A, Barnhart K.E. 2010. Chapter 110: Hematology of Laboratory Animals. I: Weiss D.J, Wardrop K.J. Shalm's veterinary hematology, 6th edition. Sid 852-888. Iowa: Blackwell publishing.
- Chu C.R, Szczodry M, Bruno S. 2010. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. Tissue engineering: Part B. Vol 16. No 1. Sid 105-115
- Dubey S, Adebajo A.O. 2008. Chapter 2: Historical and Current Perspectives on Management of OA and RA. I: Reid D. M, Miller C.G. Clinical Trials in Rheumoid Arthritis and Osteoarthritis. Sid 5-36. London: Springer.
- Flecknell P. 1996. Chapter 6: Post-operative Care. I: Flecknell P. Laboratory Animal Anaesthesia, Second edition. Sid 127-158. London: Academic Press, Elsevier Inc.
- Fossum T.W. 2009. Small Animal Surgery, Third edition. Sid 1155-1158 St. Louis, Missouri: Mosby, Elsevier Inc.
- Hilström A, Jones B, Lilliehöök I, Ström Holst B, Öberg J. 2008. Kompendium i klinisk kemi, för veterinärstudenter i åk IV. Uppsala: SLU.
- Junqueira L.C, Carneiro J. 2005. Basic Histology, Text and Atlas, 11th edition. Sid 128-133. The McGraw-Hill companies Inc.
- Karas A.Z, Danneman P.J, Cadillac J. 2008. Chapter 8: Strategies for Assessing and Minimizing Pain. I: Fish R. E, Brown M.J, Danneman P.J, Karas A.Z. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, Second edition. Sid 195-218. Academic Press, Elsevier Inc.
- McGavin M.D, Zaxhary J.F. 2007. Pathologic basis of veterinary disease, fourth edition. s1094-1105. St. Louis, Missouri: Mosby, Elsevier Inc.
- Miyazono K. 2002. Chapter 51: Bone Morphogenetic proteins - Receptors and Action. I: Bilezikian J.P, Raisz L.G, Rodan G.A. Principles of bone biology, Second edition. Sid 929-939. Academic Press, Elsevier Inc.
- Moskowitz R.W. 2009. Review: The Burden of Osteoarthritis: Clinical and Quality-of-Life Issues. The American Journal of Managed Care. Vol 15. No. 8. Sid 223-229
- Nelson R.W, Couto C.G. 2003. Small Animal Internal Medicine, Third edition. Sid 1079-1092. St. Louis, Missouri: Mosby, Elsevier Inc.
- Radostits O.M, Gay C.C, Hinchcliff K.W, Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10th edition. Sid 2025-2029. Saunders, Elsevier Limited.
- Robinson N.E, Sprayberry K.A. 2009. Current therapy in equine medicine, Sixth edition. Sid 508-511. St Louis, Missouri: Saunders, Elsevier Inc.

- Ross M.W, Dyson S.J. 2003. Diagnoses and Management of Lameness in the Horse. Sid 572-594. St Louis, Missouri: Saunders, Elsevier Inc.
- Rountree R.B, Schoor M, Chen H, Marks M.E, Harley V, Mishina Y, Kingsley D.M. 2004. BMP Receptor Signaling Is Required for Postnatal Maintenance of Articular Cartilage. Public Library of Science Biology. Vol 2. Sid 1815-1827
- Rudert M. 2002. Review: Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis in the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods. Cells Tissues Organs. Vol 171. Sid 229-240
- Shavit Y, Fish G, Wolf G, Mayburd E, Meerson Y, Yirmiya R, Beilin B. 2005. The Effects of Perioperative Pain Management Techniques on Food Consumption and Body Weight after Laparotomy in Rats. Anesthesia & Analgesia. Vol 101. Sid 1112-1116
- Sellers R.S, Zhang R, Glasson S.S, Kim H.D, Peluso D, D'Augusta D.A, Bekwith K, Morris E.A. 2000. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). Journal of Bone and Joint Surgery-American volume 82A. Sid 151-160
- Temenoff J.S, Mikos S.G. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials. Vol 21. Sid 431-440
- Wilson M.G, Kelley K, Thornhill T.S. 1990. Infection as a Complication of Total Knee-Replacement Arthroplasty. Risk factors and treatment in sixty-seven cases. The Journal of Bone and Joint Surgery. Vol 72. Sid 878-883

Bilaga 1.

Tabell 1. Analys av hematologiparametrar röd blodbild

ID	Behandling	B-EPK 10 <sup>12</sup> /L	B-Hb g/L	B-EVF	B-MCV fL	B-MCHC g/L	Ery-Reticulocuter %
3	BMP-2	7,2	153	0,47	66	323	2
5	BMP-2	5,7	127	0,37	64	349	2
38	BMP-2	4,8	106	0,31	64	343	3
60	BMP-2	*	*	*	*	*	*
81	BMP-2	6,1	136	0,39	63	353	1
116	BMP-2	5,7	121	0,36	63	337	2
153	BMP-2	6,2	133	0,39	63	342	4
154	BMP-2	6,0	127	0,37	61	347	2
1462	BMP-2	5,0	107	0,31	63	344	2
1470	BMP-2	4,6	101	0,31	67	330	2
58	Gel	5,7	121	0,36	63	337	1
61	Gel	*	*	*	*	*	*
77	Gel	5,2	117	0,33	65	352	2
149	Gel	5,5	117	0,35	64	334	3
151	Gel	6,0	126	0,36	61	345	2
1417	Gel	4,8	108	0,31	65	344	3
1449	Gel	5,3	114	0,34	63	339	2
1463	Gel	5,6	114	0,33	59	347	2
1464	Gel	4,9	108	0,31	63	351	3
1479	Gel	*	*	*	*	*	*
Medel		5,5	120	0,35	63	342	2
SD		0,7	13	0,04	2	8	1

\* Koagel i provet, analys kunde ej utföras.

Bilaga 2.

Tabell 2. Analys av totalantal vita blodkroppar med differentialräkning

ID	Behandling	B-LPK 10 <sup>9</sup> /L	B-Neutrofiler 10 <sup>9</sup> /L	B-Eosinofiler 10 <sup>9</sup> /L	B-Basofiler 10 <sup>9</sup> /L	B-Lymf 10 <sup>9</sup> /L	B-Monocyter 10 <sup>9</sup> /L
3	BMP-2	7,7	5	0	0,4	1,7	0,5
5	BMP-2	6,0	1,4	0	0,3	4	0,2
38	BMP-2	6,6	2,3	0	0,4	3,6	0,2
60	BMP-2	*	*	*	*	*	*
81	BMP-2	4,8	1,1	0	0,4	3,1	0,2
116	BMP-2	6,2	0,2	0,1	0,0	5,9	0
153	BMP-2	4,9	1,3	0	0,5	2,6	0,4
154	BMP-2	4,0	0,9	0,2	0,5	2,2	0,1
1462	BMP-2	5,2	2,5	0,2	0,5	1,9	0,2
1470	BMP-2	3,1	1,4	0	0,2	1,4	0,1
58	Gel	6,7	1,5	0,2	0,5	4,2	0,3
61	Gel	*	*	*	*	*	*
77	Gel	7,2	1,3	0	0,8	4,7	0,2
149	Gel	3,8	1,0	0,2	0,3	1	0,2
151	Gel	3,6	1,1	0,1	0,5	1,7	0,2
1417	Gel	4,2	1,1	0	0,2	2,7	0,1
1449	Gel	7,3	1,4	0,2	0,7	4,8	0,1
1463	Gel	5,7	1	0	0,7	3,7	0,1
1464	Gel	4,3	0,6	0	0,6	2,9	0,2
1479	Gel	*	*	*	*	*	*
Medel		5,4	1,5	0,1	0,4	3,1	0,2
SD		1,4	1,1	0,1	0,2	1,4	0,1

\* Koagel i provet, analys kunde ej utföras.